

ZUR FRAGE DER
GLOMERULÄREN FILTRATION
DES SÄURESTABILEN
SERUMPROTEASENINHIBITORS

Ute Mohrdieck

1978

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

Zur Frage der glomerulären Filtration des
säurestabilen Serumproteaseninhibitors

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ute Mohrdieck

aus

München

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.HOCHSTRASSER
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.NAUMANN
Dekan:	Prof.Dr.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.1978



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Theoretischer Teil	1-15
I. Funktion und Wirkungsweise der Proteaseninhibitoren	1- 2
II. Struktur und Molekulargewicht der Proteaseninhibitoren	3- 4
III. Proteaseninhibitoren des menschlichen Organismus	4- 9
1. im Serum	4- 8
2. im Harn	8- 9
IV. Gebräuchliche Clearancemethoden und deren Aussagewert	10-15
1. Allgemeine Bedeutung	10
2. Exogene Clearance	11-12
3. Endogene Clearance	12-13
4. Weitere Methoden der GFR-Bestimmung auf dem nuklearmedizinischen Sektor	14-15
B. Eigene Untersuchungen	16-34
I. Fragestellung	16-19
II. Bestimmung der Hemmaktivität säurestabiler Proteaseninhibitoren im menschlichen Serum und Harn im Vergleich zur Kreatinin-Clearance	20-31
III. Diskussion der Ergebnisse	32-34

C. Zusammenfassung

35

D. Material und Methoden

36-38

E. Literaturverzeichnis

I-III

A. Theoretischer Teil

I. Funktion und Wirkungsweise der Proteaseninhibitoren

Enzyme und ihre Inhibitoren kommen meist nebeneinander im Gewebe pflanzlicher und tierischer Organismen vor. Dadurch wird eine räumliche und zeitliche Regulation der proteolytischen Aktivität durch die Proteaseninhibitoren ermöglicht. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Enzyme nicht nur physiologische Aufgaben wie die Andauung von Nahrungseiweiß oder die Zerstörung infektiöser Keime erfüllen. Sie können auch körpereigene Proteine und proteinhaltige Gewebe angreifen. Darüber hinaus schützen die Proteaseninhibitoren auch vor körperfremden Proteasen (1,2) und greifen regulierend ein bei der Hemmung der Blutgerinnung (3,4), der Entzündungshemmung (5) und der Pathogenese des anaphylaktischen Schocks (6-8).

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt im allgemeinen durch die reversible Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes. Dabei ist das Reaktionsgleichgewicht abhängig vom pH und den Konzentrationen der Reaktionspartner. Die Reaktion des entstandenen Enzym-Substrat-Komplexes (Michaelis-Komplex) muß nun nicht zur Bildung eines Enzym-Produkt-Komplexes mit Abdissoziation des Reak-

tionsproduktes führen. Sie kann vielmehr auf verschiedenen Stufen unterbrochen sein (9):

1. Schon durch einfache Anlagerung des reaktiven Zentrums des Inhibitors an das aktive Zentrum des Enzyms ist Hemmung möglich. Bei dieser Reaktion, die der Bildung eines Michaelis-Komplexes entspricht, bleiben die Reaktionspartner unverändert. Es entsteht eine salzartige Verbindung, aus der der Inhibitor unzerstört wieder freigesetzt werden kann (10).
2. Durch Spaltung einer definierten Peptidbindung im Inhibitor kann der unter 1. genannte Enzym-Substrat-Komplex in einen Enzym-Produkt-Komplex übergehen. Es kommt dabei aber nicht zur Dissoziation der Proteolyseprodukte (11).
3. Bei hoher Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes liegen dauernd geringe Mengen freier Proteasen vor, die weitere Peptidbindungen im Inhibitormolekül zu spalten vermögen. Diese Reaktion, bei der der Inhibitor seine Stabilität und Hemmwirkung verliert, bezeichnet man nach Laskowsky als "temporary inhibition" (12).

II. Struktur und Molekulargewicht der Proteasen- inhibitoren

Bei den bisher bekannten Proteaseninhibitoren handelt es sich um Polypeptide unterschiedlichen Peptidgehalts, deren Molekulargewichte zwischen 5.000 (Pankreasinhibitoren) und 820.000 (Alpha-2-Makroglobulin) liegen.

Die verschiedenen Inhibitoren haben, ähnlich den Enzymen, eine unterschiedliche "Substratspezifität". So beschränkt sich bei den sog. spezifischen Inhibitoren die Hemmwirkung auf ein Enzym (13), während "polyvalente" Hemmstoffe, die mehrere reaktive Zentren besitzen (14) oder in polymerer Form vorliegen (15), mit mehreren Proteasen reagieren.

Durch Sequenzanalysen konnte der molekulare Aufbau vieler Inhibitoren aufgeklärt werden. Dabei stellte sich heraus, daß die Struktur der Hemmstoffe ihre außerordentliche Resistenz gegenüber dem enzymatischen Angriff bedingt. So besitzen beispielsweise die Trypsin-Inhibitoren aus Pankreas und Maissamen große Bereiche ohne Lys-X- und Arg-X-Bindungen. Diese Teile des Inhibitormoleküls sind daher für Trypsin unangreifbar und liegen wahrscheinlich neben dem aktiven Zentrum an der Oberfläche. Es zeigte sich nämlich, daß schon geringe Störungen der Tertiärstruk-

tur, wie Reduktion der S-S-Brücken oder Auflösung der H-Brücken, die Hemmwirkung des Inhibitors aufheben und ihn für Trypsin angreifbar machen (16,17).

Es gibt zwei Gruppen von Trypsininhibitoren, die sich bezüglich des aktiven Zentrums unterscheiden. Beim sog. "Lysin-Inhibitor" ist ein definiertes Lysin, beim sog. "Arginin-Inhibitor" ein definiertes Arginin für die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes verantwortlich. Dafür spricht einmal, daß Trypsin bevorzugt Lys-X- und Arg-X-Bindungen spaltet. Zum anderen lassen sich diese Inhibitoren durch spezifische Derivatisierungsreaktionen an den entsprechenden Lysin- bzw. Arginin-Resten reversibel inaktivieren (18,19).

III. Proteaseninhibitoren des menschlichen Organismus

1) im Serum

Zu den wichtigsten Proteaseninhibitoren des Serums gehört das Alpha-1-Antitrypsin. Es stammt aus der Alpha-1-Globulinfraktion und hat ein breites Hemmspektrum, das neben Trypsin und Chymotrypsin auch Plasmin, Pankreas-Kallikrein, Ela-

stase und Leukozytenproteasen umfaßt. 90% der Trypsin-hemmenden Aktivität des Serums entfallen auf diesen Inhibitor (20).

Beim Alpha-1-Antichymotrypsin handelt es sich um einen spezifischen Chymotrypsin-Inhibitor, der im Post-Albumin-Bereich der Serumelektrophorese liegt (20).

Zwischen der Alpha-1- und der Alpha-2-Globulinfraktion läßt sich der nach dieser Lage benannte Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor (kurz ITI) nachweisen. Neben einer geringgradigen antitryptischen Aktivität besitzt er nur noch andgedeutete Hemmwirkung gegenüber Plasmin und Chymotrypsin (20).

Die übrigen ca. 10% der Trypsin-inhibitorischen Kapazität des Serums entfallen auf das Alpha-2-Makroglobulin. Dieser polyvalente Inhibitor vermag außerdem Chymotrypsin, Plasmin, Plasma-Kallikrein, Thrombin und Elastase zu hemmen (20).

Bei den bisher genannten Stoffen handelt es sich um säurelabile Inhibitoren. Nach Fällung mit Perchlorsäure lassen sich im Serum aber noch säurestabile Hemmstoffe nachweisen, die etwa 3% der insgesamt vorhandenen antiproteolytischen Aktivität ausmachen. Mit diesen säurestabilen Pro-

teaseninhibitoren befaßt sich die vorliegende Arbeit.

Die säurestabile antitryptische Aktivität des Serums liegt normalerweise zwischen 5 und 10 IMU/ml mit einem Häufigkeitsmaximum bei 8 IMU/ml (21). Im Blut nierenkranker Patienten konnte jedoch ein Konzentrationsanstieg des säurestabilen Proteaseninhibitors bis zum 30-fachen der Norm nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, daß der signifikante Anstieg des Serum-inhibitorspiegels eher eine Einschränkung der Nierenfunktion anzeigt als das Serumkreatinin, das im allgemeinen zur Funktionsdiagnostik der Niere bestimmt wird. So manifestierten sich Abstoßungskrisen nach Nierentransplantationen in einem signifikanten Anstieg der Serumkonzentration des säurestabilen Proteaseninhibitors, und zwar 1-2 Tage bevor das Serumkreatinin die Normgrenze überschritt (21).

Es gelang, aus nativem und enteiweißtem Humanplasma durch Affinitätschromatographie an wasserunlöslichem Trypsinharz einen Proteaseninhibitor mit dem Molekulargewicht 22.000 (zunächst kurz I 22) nachzuweisen. Einen zweiten isolierten Hemmstoff mit dem Molekulargewicht 44.000 hielt man für ein Dimeres des I 22, da beide dieselbe Kreuzreaktion mit dem Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor (ITI) zeigten und die gleiche spezifische Aktivität und Aminosäurezusammen-

setzung aufwiesen (21). Der I 22 besitzt wohl einen großen Kohlehydratanteil. Daher ist er im physiologischen Milieu von einer Hydrathülle umgeben und täuscht bei der Säulenchromatographie ein zu hohes Molekulargewicht vor. Aus der experimentell bestimmten spezifischen Aktivität wurde für den Inhibitor nämlich nur ein Molekulargewicht von 17.000 errechnet (daher Kurzbezeichnung I 17).

Weitere Untersuchungen zeigten, daß es sich bei dem I 17 um ein im Organismus nicht vorkommendes Kunstprodukt handelt, das nur entsteht, wenn Trypsin im Überschuß zugesetzt wird. Die säurestabile antitryptische Aktivität im physiologischen Milieu geht von einem Hemmstoff aus, der nach Gelfiltration auf Sephadex G 200 im Elutionsbereich von Proteinen mit dem Molekulargewicht 65.000 entdeckt wurde (daher zunächst kurz I 65) (22). Auch der I 65 scheint einen großen Kohlehydratanteil zu besitzen, da nach Neuraminidasebehandlung seine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit stark vermindert ist, seine inhibitorische Aktivität aber gleich bleibt. Die spezifische Aktivität dieses Inhibitors wurde experimentell bestimmt und daraus sein Molekulargewicht berechnet. Es beträgt 34.000 (daher kurz I 34). Es konnte nachgewiesen werden, daß der I 34 neben anderen Derivaten nach Einwirkung spezieller Proteasen durch limitierte Proteolyse aus dem ITI entsteht (23).

Der I 34 erreicht mit seiner Hydrathülle ein Molekulargewicht von 65.000 und liegt damit an der oberen Grenze der glomerulär filtrierbaren Substanzen. Dadurch wurden vergleichende Untersuchungen interessant, die zeigen sollten, ob die Serumkonzentration dieses Inhibitors ein verlässliches und empfindliches Maß für die Nierenfunktion darstellt. Von besonderer Bedeutung war bei unseren Untersuchungen die Frage, ob die Serumkonzentration des I 34 im Unsicherheitsbereich der Kreatinin-Clearance, d.h. zwischen 70 und 100 ml/min, exaktere Rückschlüsse auf eine mögliche Einschränkung des Glomerulusfiltrats zuläßt als der Serumkreatininspiegel.

2) im Harn

Zwischen der antiproteolytischen Aktivität des Harns und den Proteaseninhibitoren des Serums wurde zunächst kein Zusammenhang vermutet. Verschiedene Autoren untersuchten lediglich die Ausscheidungsrate der als "Mingin" bezeichneten, nur partiell gereinigten und nicht genügend charakterisierten Hemmsubstanzen des Harns bei bestimmten Krankheiten (24).

Proksch und Mitarbeiter stellten bei neueren Untersuchungen fest, daß der säurestabile Harninhibitor eine immunologische Kreuzreaktion mit

dem Serum-ITI aufweist. Sie ermittelten für den Inhibitor ein Molekulargewicht von 70.000 (25-27). Die von Hochstraßer und Mitarbeitern durch Affinitätschromatographie aus Harn isolierten säurestabilen Proteaseninhibitoren wiesen dagegen nur ein Molekulargewicht von 22.000 bzw. 44.000 auf, zeigten aber ebenfalls die Kreuzreaktion mit dem ITI. Durch Aminosäureanalysen konnte die Identität dieser Hemmstoffe nachgewiesen werden (21). Weitere Untersuchungen belegten, daß das physiologischerweise in Serum und Harn vorkommende inhibitorisch aktive ITI-Derivat ein Molekulargewicht von 34.000 besitzt und daß die durch Affinitätschromatographie isolierten Inhibitoren offenbar Abbauprodukte dieses Inhibitors darstellen. Es ist nämlich möglich, den I 34 durch Trypsin im Überschuß ohne Aktivitätsverlust zum I 17 abzubauen.

Für die Tagesausscheidung des Inhibitors im Harn fand man Werte zwischen 4.000 und 22.000 IMU/die mit einem Häufigkeitsmaximum bei 10.000 IMU/die (21). Verschiedene Nephropathien führen zu einer erheblichen Erhöhung der täglichen Ausscheidungsrate.

IV. Gebräuchliche Clearanceverfahren und deren Aussagewert

1. Allgemeine Bedeutung

Eine der wichtigsten Nierenfunktionsprüfungen ist die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate. Diese Größe kann durch verschiedene Clearanceverfahren festgestellt werden.

Unter Clearance eines Stoffes versteht man diejenige Menge Plasma, die pro Minute von diesem Stoff völlig gereinigt, "geklärt" wird.

Der Clearancewert berechnet sich aus der Formel $U \times V / P$, wobei U die Konzentration im Harn, V das Harnzeitvolumen und P die Konzentration im Plasma bedeuten, und hat die Dimension ml/min (28).

Es gibt eine Reihe verschiedener Testsubstanzen, die für die Clearancebestimmung verwendet werden. Man unterscheidet dabei zwischen endogener Clearance bei Stoffen, die physiologischerweise in Plasma und Harn vorkommen, wie Kreatinin, und exogener Clearance bei körperfremden Stoffen, wie Inulin und Mannit.

2. Exogene Clearance

Damit die Clearance der glomerulären Filtrationsrate entspricht, müssen an die Testsubstanzen folgende Bedingungen gestellt werden:

- a. Sie dürfen nicht toxisch sein.
- b. Ihre Serumkonzentration muß im Versuchszeitraum konstant sein.
- c. Sie müssen frei filtrierbar sein bzw. ihre Filtrationsrate muß abschätzbar sein.
- d. Sie dürfen tubulär weder sezerniert noch resorbiert werden oder ihre Resorptionsquote muß bekannt oder konstant sein (29).

Die oben genannten Bedingungen werden optimal vom Inulin erfüllt, einem Fruktose-Polysaccharid mit dem Molekulargewicht 5.000. Das Inulin wird frei filtriert und praktisch nicht tubulär rückresorbiert. Ein konstanter Plasmaspiegel kann durch Dauerinfusion erzeugt werden, was sich allerdings besonders bei Ödempatienten als langwierig und schwierig erweist. Zur vollständigen Gewinnung des Harns ist ein Dauerkatheter erforderlich. Es sind also umfassende Vorsichtsmaßnahmen notwendig, um aufsteigende Infektionen zu vermeiden.

Wegen dieser hauptsächlich technischen Schwierigkeiten und der erheblichen Belastung für den Patienten wird die Inulin-Clearance in der Mehrzahl

für bestimmte, vor allem wissenschaftliche Fragestellungen verwendet. In der klinischen Praxis ist man zur weitaus einfacheren Bestimmung endogener Substanzen übergegangen.

3. Endogene Clearance

Das im Körper gebildete Kreatinin ist im Plasma in weitgehend konstanter Konzentration vorhanden. Da es frei filtriert und nicht tubulär rückresorbiert wird, erfüllt es in hohem Maße die Bedingungen, die an eine Clearance-Testsubstanz zu stellen sind. Wegen der Einfachheit der Bestimmung hat sich für Routinezwecke die endogene Kreatinin-Clearance mehr und mehr durchgesetzt.

Bei dieser Methode ist ein Blasenkatheter nicht erforderlich, da die Bestimmung im Sammelurin von mehreren Stunden erfolgt. Da wegen des ohnehin vorhandenen Plasmaspiegels auch eine Dauerinfusion unnötig ist, ist die Belästigung für den Patienten sehr gering. Die Untersuchung kann daher beliebig oft wiederholt werden und ist besonders für Routinebestimmungen und Verlaufsbeobachtungen sehr geeignet.

Kreatinin wird in bestimmter Relation zur Muskelmasse gebildet. Um individuelle Unterschiede

auszugleichen, werden die gefundenen Werte auf eine Körperoberfläche von $1,73 \text{ m}^2$ umgerechnet und dadurch eine Interpretation der Ergebnisse erleichtert (28).

Bei normalem Plasmaspiegel von $0,6-1,2 \text{ mg\%}$ bei Männern und $0,5-1,0 \text{ mg\%}$ bei Frauen gibt die Kreatinin-Clearance relativ exakt die GFR wieder. Steigt allerdings die Plasmakonzentration auf Grund einer Nierenfunktionsstörung oder exogener Zufuhr auf über $2 \text{ mg\%}$ an, so kommt es zusätzlich zur glomerulären Filtration auch zur tubulären Sekretion des Kreatinins, so daß im Stadium der Niereninsuffizienz die Kreatinin-Clearance höher sein kann als die GFR (30). In diesem Fall ist die Genauigkeit der Kreatinin-Clearance der Inulin-Clearance weit unterlegen.

Eine weitere Fehlerquelle stellt auch die Urinsammlung dar. Die Urinmenge muß über eine oder mehrere exakt bestimmte Perioden genau ermittelt werden, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

Die Kreatininkonzentration wird durch eine Farbreaktion photometrisch gemessen. Die gleiche Reaktion liefern die sogenannten Chromogene. Diese Substanzen können erhebliche Analysenfehler verursachen, besonders dann, wenn ihre Plasmakonzentration durch eine Einschränkung des Glomerulusfiltrats erhöht ist (31).

4. Weitere Methoden der GFR-Bestimmung auf dem nuklearmedizinischen Sektor

Mit Radiopharmaka lassen sich sowohl die glomeruläre als auch die tubuläre Clearance bestimmen. Als brauchbare Testsubstanzen erwiesen sich J-markierte Inuline, ^{57}Co oder ^{58}Co -Vitamin B_{12} , ^{131}J -Visotrast und Chelatbildner wie ^{51}Cr oder $^{113\text{m}}\text{In}$ markiertes EDTA (Äthylendiamintetraacetat) (31). Wegen seiner guten Korrelation zur Inulin-Clearance hat sich das ^{51}Cr -EDTA mehr und mehr durchgesetzt.

Nach Lit.32 werden folgende nuklearmedizinische Clearancetechniken unterschieden:

1. Nach Injektion eines Radiopharmakons wird Blut entnommen und dessen Aktivität im Bohrlochkristall bestimmt. Die Clearance ergibt sich aus dem Verteilungsvolumen multipliziert mit der Verschwinderate.
2. Die Verschwinderate wird nach Injektion der Testsubstanz direkt durch unblutige, externe Messungen über Schulter, Herz oder anderen Referenzarealen bestimmt.
3. Die Aktivität der Testsubstanz wird über dem ganzen Körper mit Ausnahme von Niere und Blase gemessen (sog. teilabgeschirmter Ganzkörpermeßstand). Dabei entspricht die Verschwinderate der Ausscheiderate durch die Nieren.

Bei Verwendung von ^{131}J -Hippuran besteht die Möglichkeit, aus der Kombination von Gesamtclearance und Isotopennephrogramm die seitengetreunte Clearance zu berechnen.

Der größte Vorteil der nuklearmedizinischen Verfahren ist wohl die Möglichkeit, durch unblutige Messung selbst kleinste Mengen zu erfassen. Man darf allerdings die Gefahr für den Körper durch die Injektion radioaktiven Materials nicht vernachlässigen. Eine beliebig häufige Wiederholung dieser Bestimmungsmethode ist daher nicht möglich.

B. Eigene Untersuchungen

I. Fragestellung

Die Nieren sind das wichtigste Organ zur Kontrolle des Salz- und Wasserhaushalts. Ihre Aufgabe besteht darin, Schwankungen hinsichtlich des Volumens, der Osmolarität, des pH-Werts und der Konzentration von Salzen und anderen gelösten Substanzen in der extrazellulären Flüssigkeit so weit wie möglich auszugleichen.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das sich aus Glomerulus mit Bowman'scher Kapsel, proximalem Konvolut, Henle-Schleife und distalem Konvolut zusammensetzt und in ein mehreren Nephronen gemeinsames Sammelrohr mündet.

Das Glomerulus wird durch Invagination eines Kapillarknäuels in das erweiterte, blind beginnende Nephron, die Bowman'sche Kapsel, gebildet. Durch die Membran der glomerulären Kapillaren wird vom Plasma eine Flüssigkeit, der sog. Primärharn, abgepreßt. Dieses Ultrafiltrat enthält nur Spuren von Eiweiß und ist frei von den korpuskulären Elementen des Blutes. Bei der glomerulären Filtration ist keine Stoffwechselenergie erforderlich. Die treibende Kraft für diesen Vor-

gang ist der bei der Filtration wirksame Netto-
druck (effektiver Filtrationsdruck), der sich aus
der algebraischen Summe von hydrostatischem und
osmotischem Druckgefälle über der Kapillarmem-
bran und dem Kapseldruck ergibt und etwa 50 mm Hg
beträgt (29).

Man nimmt an, daß der Durchtritt von Wasser und
gelösten Substanzen an der glomerulären Kapil-
larmembran durch Poren oder Porenäquivalente er-
folgt, deren Weite entscheidend dafür ist, bis zu
welcher Molekülgröße Substanzen noch filtriert
werden können. Das sog. "glomeruläre Molekular-
sieb" besteht aus mehreren Schichten: einmal den
glomerulären Kapillaren, die innen mit einem En-
dothel ausgekleidet sind, das 500-1000 Å große
Kapillarfenster aufweist und daher kein Filtra-
tionshindernis darstellt. Auf der Außenseite der
Kapillaren liegen Epithelzellen, deren zytoplas-
matische Fortsätze keine homogene Epithelschicht
bilden, sondern ineinander verzahnt und so ange-
ordnet sind, daß Zwischenräume von 200-500 Å frei-
bleiben, die ebenfalls kein Passagehindernis dar-
stellen. Als Filtrationsbarriere kommt daher nur
die Basalmembran in Frage, die aus drei Schichten
aufgebaut ist: zwei elektronenoptisch durchläs-
sigere Schichten umgeben eine elektronenoptisch
dichtere Mittelschicht. Diese Mittelschicht be-
steht aus 30-60 Å dicken Filamenten, die in gegen-
seitigem Abstand von 30-75 Å dreidimensional
miteinander vernetzt sind. Sie bestehen wahrschein-
lich aus Kollagen und sind in eine homogene Ma-

trix eingebettet (30). Dieses filamentäre Netzwerk der Mittelschicht stellt wohl die postulierten Porenäquivalente dar, die offenbar in ihrer Weite einer statistischen Verteilung folgen. Man fand nämlich, daß die Größe der Passagewege innerhalb der Membran Unterschiede zwischen 2 und 45 Å als äquivalentem Porenradius aufweist (29).

Das Grenzmolekulargewicht für den Membrandurchtritt liegt bei 80.000-90.000, was etwa einem maximalen Porenradius von 42-45 Å entspricht. Die erste meßbare Behinderung der Membranpassage beginnt schon bei Stoffen mit dem Molekulargewicht 5000 (z.B. Inulin). Mit zunehmendem Molekülradius nimmt die Filtrationsrate ab und beträgt z.B. für Serumalbumin (MG 69.000, Molekülradius 39,4) nur noch 1% des Kreatinins, das mit seinem Molekulargewicht von 100 noch zu 100% filtriert wird (29).

Obwohl die Basalmembran den Durchtritt von Proteinen weitgehend behindert, wird doch eine geringe Menge glomerulär filtriert. Nach Addis enthält die menschliche Cerebrospinalflüssigkeit, die am ehesten dem glomerulären Ultrafiltrat entspricht, mehr als 10 mg Protein/100 ml. Nimmt man dieselbe Zahl für das Glomerulusfiltrat an und multipliziert mit der Filtrationsrate (etwa 180 l/die), so betrüge die täglich von den Nieren filtrierte Menge an Protein etwa 18 g (33).

Da aber im Harn nicht mehr als 100 mg/die ausgeschieden werden, nimmt man an, daß bis zu 99% der filtrierte Proteinmenge rückresorbiert werden. Elektronenoptische Untersuchungen zeigten, daß die proximalen Tubuluszellen in Form einer Pinozytose Proteine aus der Tubulusflüssigkeit aufnehmen. Durch proteolytische Fermente werden die Proteine dann in der Tubuluszelle in niedermolekulare Verbindungen gespalten, die in das Zytoplasma übertreten.

Der säurestabile Serum-inhibitor I 34 liegt mit seinem apparenten Molekulargewicht an der oberen Grenze der frei filtrierbaren Substanzen. Es stellt sich nun die Frage, wie hoch die Filtrationsrate des Inhibitors ist, ob eine tubuläre Rückresorption erfolgt und inwieweit die Konzentration des Inhibitors in Serum und Urin mit der GFR korreliert ist. Wir bestimmten daher Serumspiegel und Clearance des I 34 und stellten sie der Serumkreatininkonzentration und der Kreatininclearance gegenüber.

II. Bestimmung der Hemmaktivität säurestabiler Proteaseninhibitoren im menschlichen Serum und Harn im Vergleich zur Kreatininclearance

Für diese Arbeit wurden Serum und Urin von 65 stationären und ambulanten Patienten untersucht, die entweder als Nierenkranke routinemäßig überwacht wurden oder bei denen Verdacht auf eine Nephropathie bestand. Das untersuchte Kollektiv setzte sich aus Patienten beiderlei Geschlechts und aller Altersklassen zusammen. Es wurden der Serumkreatininspiegel, die Kreatininclearance und die Konzentration des nach Eiweißfällung nachweisbaren Proteaseninhibitors bestimmt (siehe Abschnitt "Material und Methoden").

Schon bei früher im Arbeitskreis Hochstraßer durchgeführten Untersuchungen stellte sich heraus, daß die normale Serumkonzentration des Inhibitors eng mit dem Serumkreatininspiegel und der Kreatininclearance korreliert ist (34). Diese Feststellung wurde durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt (siehe Tabelle 2). Der physiologische Serumkreatininspiegel liegt bei 0,6-1,2 mg% für Männer und 0,5-1,0 mg% für Frauen. Der entsprechende Clearancewert beträgt mindestens 100 ml/min. Für diese Werte ergab sich eine Serumkonzentration von 4-10 IMU/ml mit einem Maximum bei 6-8 IMU/ml. Dieses Verteilungsmuster entspricht einer fast idealen Gauß'schen Glockenkurve.

Die Testergebnisse pathologischer Fälle bestätigten die Vermutung, daß auch bei eingeschränktem Glomerulusfiltrat die Seruminhibitorkonzentration entsprechend dem Serumkreatininspiegel und der Kreatininclearance verändert wird. Bei einer Kreatininclearance unter 70 ml/min steigt der Serumkreatininspiegel auf Werte über 1,0 bzw. 1,2 mg% an, und auch die Konzentration des Inhibitors ist dann signifikant erhöht (siehe Tabelle 3).

Von besonderem Interesse war für uns die Frage, wie sich der Seruminhibitorspiegel im sog. Unsicherheitsbereich der Kreatininclearance zwischen 70 und 100 ml/min verhält. Dieser Bereich liegt an der unteren physiologischen Grenze und entspricht einer noch normalen oder nur leicht erhöhten Serumkreatininkonzentration. Die exkretorische Nierenfunktion kann dann bereits eingeschränkt sein, ohne daß dies aus den Laborwerten ersichtlich ist.

In dem von uns untersuchten Kollektiv waren 14 Patienten, deren Kreatininclearancewerte in den oben beschriebenen Bereich fielen. Wir bestimmten die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen in Serum und Harn. Dabei ergab sich für jeden dieser Fälle eine signifikante Erhöhung des Seruminhibitorspiegels. Die Werte lagen zwischen 11,60 und 27,70 IMU/ml. Die Serumkreatininkonzentrationen hingegen gaben noch keinerlei Hin-

weis auf den Beginn einer Nierenfunktionsstörung. Alle Werte lagen im Normbereich (siehe Tabelle 4).

Bei den Urinuntersuchungen ergab sich, daß die Inhibitorkonzentration im Harn eine große Schwankungsbreite aufweist. Für die Tagesausscheidung des Inhibitors fand man Werte zwischen 4.000 und 22.000 IMU/die mit einem Häufigkeitsmaximum bei 10.000 IMU/die (34). Wir berechneten analog zur Kreatininclearance aus Serum- und Urinkonzentration des Inhibitors die Inhibitorclearance (Formel siehe unter "Methoden"). Dabei setzten wir voraus, daß der Inhibitor glomerulär frei filtrierbar bzw. seine Filtrationsrate abschätzbar ist und daß keine tubuläre Rückresorption erfolgt oder zumindest die Resorptionsquote konstant ist. Eine aktive tubuläre Sekretion ist praktisch auszuschließen, da bisher für kein Protein ein solcher Mechanismus bewiesen werden konnte.

Abb. 1 zeigt die Inhibitorclearance in Abhängigkeit vom Seruminhitorspiegel. Es zeigt sich, daß die Serumkonzentration des Inhibitors bei sinkenden Clearancewerten ansteigt. Daraus läßt sich schließen, daß der Inhibitor durch die Nieren ausgeschieden wird. Dies wird auch belegt durch die Tatsache, daß sich bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate mit Anstieg des Serumkreatinins die Inhibitorkonzentration

tration im Serum signifikant erhöht (siehe Tabelle 3).

Interessant ist nun die Frage, zu welchem Prozentsatz der I 34 filtriert wird. Setzt man voraus, daß keine Rückresorption erfolgt und die glomeruläre Filtrationsrate 120 ml/min beträgt, so läßt sich für eine I 34-Tagesausscheidung von 10.000 IMU und eine Serumkonzentration von 8 IMU/ml folgende Berechnung aufstellen: pro Minute werden 120 ml Serum mit 8 IMU/ml filtriert = 960 IMU/ml, d.h. in 24 Stunden 1.380.000 IMU. Da die Tagesausscheidung aber nur 10.000 IMU beträgt, entspräche das einer Filtrationsrate von etwa 0,7 %. Das würde also bedeuten, daß entweder die Filtrationsrate zwischen 0,5 und 1,0 % liegt oder aber bei höherer Filtrationsrate eine tubuläre Rückresorption erfolgt. Für Serumalbumin, das ein ähnliches Molekulargewicht wie der I 34 aufweist, fand man eine Filtrationsrate von 1 % und stellte fest, daß es tubulär fast vollständig rückresorbiert wird. Eine hohe Rückresorptionsquote ist allerdings für den I 34 sehr unwahrscheinlich, da es sich hier um ein stark saures Protein handelt und frühere Versuche zeigten, daß saure Moleküle rasch ausgeschieden werden, ohne daß eine tubuläre Rückresorption erfolgt (35).

Die Berechnung der Inhibitorclearance ist praktisch bedeutungslos, da sie auf noch unbewiese-

nen Voraussetzungen beruht. Wenn der Inhibitor als Clearancesubstanz Verwendung finden sollte, so müßten Filtrationsrate und Resorptionsquotient genau bekannt sein. Außerdem müßte man den Serum-inhibitorspiegel mindestens stündlich bestimmen, um die Schwankungen auszugleichen, die durch die unterschiedliche Inhibitorproduktion entstehen. Der tubuläre Abbau des I 34 kann vernachlässigt werden, da das Abbauprodukt, der I 17, genauso erfaßbar ist. Möglicherweise wird der I 34 auch im Harn abgebaut, da sich im Urin nach längerem Stehen der I 17 nachweisen läßt. Da aber beide Inhibitoren im Hemmstofftest quantitativ und qualitativ dieselbe Reaktion zeigen, spielt das bei der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität des Urins keine Rolle.

Ein direkter Vergleich mit der Kreatininclearance und eine Beurteilung der glomerulären Filtrationsrate anhand der Inhibitorclearance ist also nicht möglich, während die Bestimmung des Serum-inhibitorspiegels zur Nierenfunktionsdiagnostik herangezogen werden kann.

Tabelle 1: Gesamtergebnisse

Trypsininhibitor			Kreatinin	
	Serum(IMU/ml)	Clearance(ml/min)	Serum(mg%)	Clearance(ml/min)
1.)	11,60	2,03	1,14	76,3
2.)	21,47	1,24	1,52	69,4
3.)	7,36	3,80	0,99	107,0
4.)	4,31	2,97	0,89	125,0
5.)	9,87	1,06	1,12	153,7
6.)	26,94	1,44	1,90	58,5
7.)	4,55	14,11	0,85	140,0
8.)	6,39	4,25	0,87	135,7
9.)	4,62	4,83	0,74	124,2
10.)	12,59	0,82	1,17	54,0
11.)	25,90	4,23	1,17	100,0
12.)	27,24	1,09	0,80	88,4
13.)	6,79	0,80	0,96	112,9
14.)	5,54	0,98	0,52	177,8
15.)	4,39	6,39	0,74	184,3
16.)	23,80	4,47	0,90	95,0
17.)	7,93	0,72	0,73	131,0
18.)	7,05	1,81	0,69	128,8
19.)	6,15	4,35	0,68	126,0
20.)	7,76	2,25	0,71	108,0
21.)	26,07	0,69	1,40	64,0
22.)	6,01	1,45	0,75	114,0
23.)	27,70	1,33	0,64	84,5
24.)	8,13	1,42	0,75	178,0
25.)	15,15	1,71	1,02	96,2
26.)	3,03	7,27	0,98	115,2
27.)	6,55	1,47	1,09	118,1
28.)	7,60	2,79	0,98	125,8
29.)	18,30	0,91	1,32	52,6
30.)	3,03	1,04	0,89	133,9
31.)	5,70	2,41	0,96	145,4
32.)	15,05	1,22	0,95	94,2

Fortsetzung Tabelle 1:

Trypsininhibitor			Kreatinin	
	Serum (IMU/ml)	Clearance (ml/min)	Serum (mg%)	Clearance (ml/min)
33.)	25,30	0,51	1,31	65,3
34.)	4,28	2,18	0,78	114,9
35.)	4,55	8,59	0,98	131,8
36.)	20,70	0,77	1,35	60,5
37.)	4,60	1,69	0,71	123,7
38.)	16,76	4,44	1,12	94,2
39.)	18,35	1,11	1,09	90,5
40.)	3,80	2,43	0,72	122,2
41.)	4,80	2,49	0,60	114,5
42.)	6,05	2,71	0,92	105,5
43.)	5,16	2,19	0,90	105,4
44.)	12,28	0,99	1,11	77,6
45.)	18,03	1,25	1,20	90,2
46.)	3,80	12,73	0,54	203,9
47.)	6,27	7,49	1,12	117,2
48.)	7,36	2,55	1,00	130,8
49.)	3,80	2,58	0,69	119,7
50.)	3,80	2,12	0,74	155,0
51.)	7,60	0,73	1,00	128,7
52.)	6,80	3,13	0,92	104,7
53.)	5,30	1,01	0,91	122,5
54.)	5,30	2,00	0,60	211,0
55.)	3,03	3,05	0,66	222,6
56.)	6,44	1,35	1,08	160,3
57.)	4,55	0,80	0,85	168,8
58.)	6,05	0,92	0,73	186,2
59.)	19,55	2,33	1,25	91,3
60.)	4,55	9,86	0,90	158,8
61.)	3,80	3,53	0,74	151,3
62.)	22,80	0,75	1,09	81,9
63.)	5,30	2,17	0,75	135,5
64.)	17,10	1,08	1,10	79,3
65.)	5,90	2,81	0,92	124,7

Tabelle 2: Nierengesunde Patienten

Trypsininhibitor		Kreatinin	
Serum(IMU/ml)	Clearance(ml/min)	Serum(mg%)	Clearance(ml/min)
3.)	7,36	3,80	0,99
4.)	4,31	2,97	0,89
5.)	9,87	1,06	1,12
7.)	4,55	14,11	0,85
8.)	6,39	4,25	0,87
9.)	4,62	4,83	0,74
10.)	6,79	0,80	0,96
11.)	5,54	0,98	0,52
12.)	4,39	6,39	0,74
13.)	7,93	0,72	0,73
14.)	7,05	1,81	0,69
15.)	6,15	4,35	0,68
16.)	7,76	2,25	0,71
17.)	6,01	1,45	0,75
18.)	8,13	1,42	0,75
19.)	3,03	7,27	0,98
20.)	6,55	1,47	1,09
21.)	7,60	2,79	0,98
22.)	3,03	1,04	0,89
23.)	5,70	2,41	0,96
24.)	4,28	2,18	0,78
25.)	4,55	8,59	0,98
26.)	4,60	1,69	0,71
27.)	3,80	2,43	0,72
28.)	4,80	2,49	0,60
29.)	6,05	2,71	0,92
30.)	5,16	2,19	0,90
31.)	3,80	12,73	0,54
32.)	6,27	7,49	1,12
33.)	7,36	2,55	1,00

Fortsetzung Tabelle 2:

Trypsininhibitor			Kreatinin	
Serum(IMU/ml)	Clearance(ml/min)		Serum(mg%)	Clearance(ml/min)
49.)	3,80	2,58	0,69	119,7
50.)	3,80	2,12	0,74	155,0
51.)	7,60	0,73	1,00	128,7
52.)	6,80	3,13	0,92	104,7
53.)	5,30	1,01	0,91	122,5
54.)	5,30	2,00	0,60	211,0
55.)	3,03	3,05	0,66	222,6
56.)	6,44	1,35	1,08	160,3
57.)	4,55	0,80	0,85	168,8
58.)	6,05	0,92	0,73	186,2
60.)	4,55	9,86	0,90	158,8
61.)	3,80	3,53	0,74	151,3
63.)	5,30	2,17	0,75	135,5
65.)	5,90	2,81	0,92	124,7

Tabelle 3: Patienten mit Niereninsuffizienz

Trypsininhibitor		Kreatinin	
Serum(IMU/ml)	Clearance(ml/min)	Serum(mg%)	Clearance(ml/min)
2.)	21,47	1,24	1,52
6.)	26,94	1,44	1,90
10.)	12,59	0,82	1,17
21.)	26,07	0,69	1,40
29.)	18,30	0,91	1,32
33.)	25,30	0,51	1,31
36.)	20,70	0,77	1,35

Tabelle 4: Patienten im Unsicherheitsbereich der Kreatinin-Clearance

Trypsininhibitor		Kreatinin		
Serum (INK/ml)	Clearance (ml/min)	Serum (mg/l)	Clearance (ml/min)	
1.)	11,60	2,03	1,14	76,3
11.)	25,90	4,23	1,17	100,0
12.)	27,24	1,09	0,80	88,4
16.)	23,80	4,47	0,90	95,0
23.)	27,70	1,33	0,64	84,5
25.)	15,15	1,71	1,02	96,2
32.)	15,05	1,22	0,95	94,2
38.)	16,76	4,44	1,12	94,2
39.)	18,35	1,11	1,09	90,5
44.)	12,28	0,99	1,11	77,6
45.)	18,03	1,25	1,20	90,2
59.)	19,55	2,33	1,25	91,3
62.)	22,80	0,75	1,09	81,9
64.)	17,10	1,08	1,10	79,3

Serum-Inhibitor
(IMU/ml)

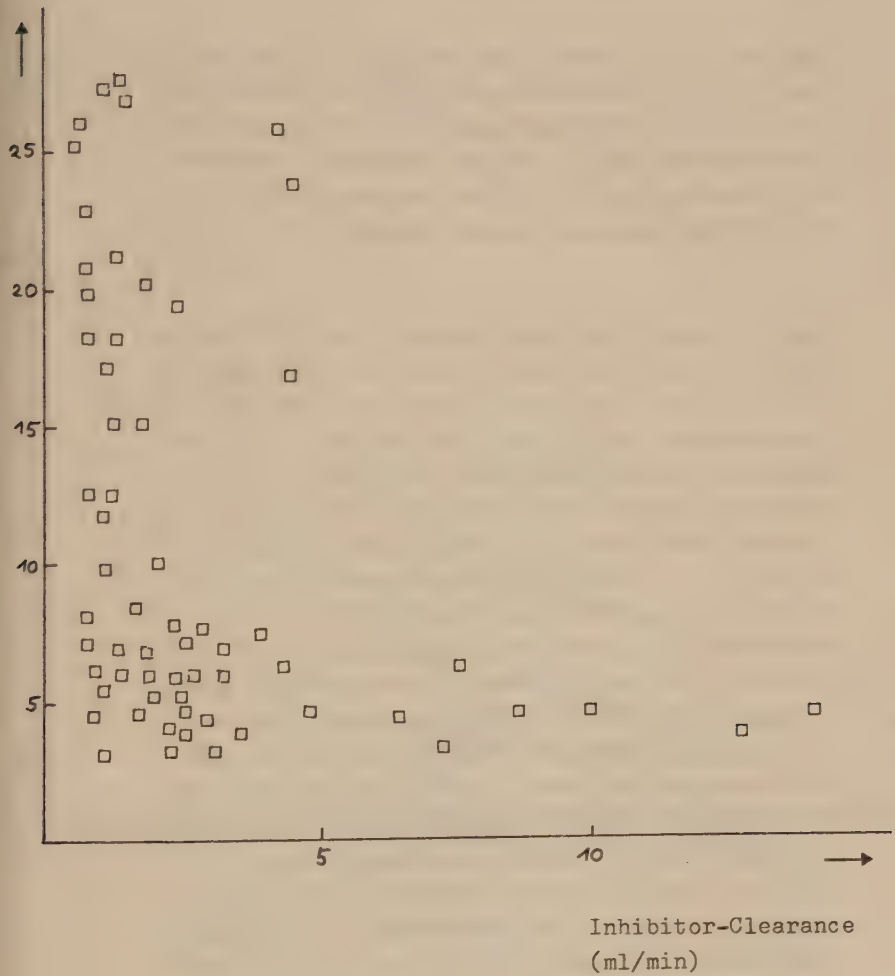


Abb.1: Abhängigkeit des Seruminhibitorspiegels von der
Inhibitorclearance

III. Diskussion der Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigten, daß die Bestimmung der Inhibitorclearance keine Rückschlüsse auf die Nierenfunktion zuläßt, da die Inhibitor-tagesausscheidung in weiten Bereichen schwankt und bisher weder die Filtrationsrate noch die Rückresorptionsquote genau bekannt sind.

Durch theoretische Überlegungen kamen wir zu dem Schluß, daß die Filtrationsrate des I 34 zwischen 0,5 und 1,0% liegen müßte. Setzt man nun eine Filtrationsrate von 1% und eine fehlende oder konstante Rückresorption voraus, so lassen sich für die Abhängigkeit des Serum-inhibitorspiegels von der GFR Idealkurven aufstellen. Abb. 2 zeigt diese Kurven für eine Inhibitor-tagesausscheidung von 10.000, 20.000, 30.000 und 40.000 IMU, also für verschiedene Stadien der Nierenfunktion. In Abb. 3 sind die von uns gefundenen Serum-inhibitorwerte in Abhängigkeit vom zugehörigen Kreatininclearancewert dargestellt. Da bei einer Serumkreatininkonzentration unter 2 mg% die Kreatininclearance der GFR entspricht, lassen sich beide Abbildungen direkt vergleichen. Dabei zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung im Kurvenverlauf. Die Streuung der Kurvenpunkte in unserer Abbildung rührt daher, daß die Werte von Patienten mit unterschiedlicher Tagesausscheidung stammen. Ein Vergleich der beiden Abbildungen würde also unsere Voraussetzung bestätigen, daß die Filtrationsrate des I 34 bei etwa 1% liegt.

Serum-Inhibitor
(IMU/ml)

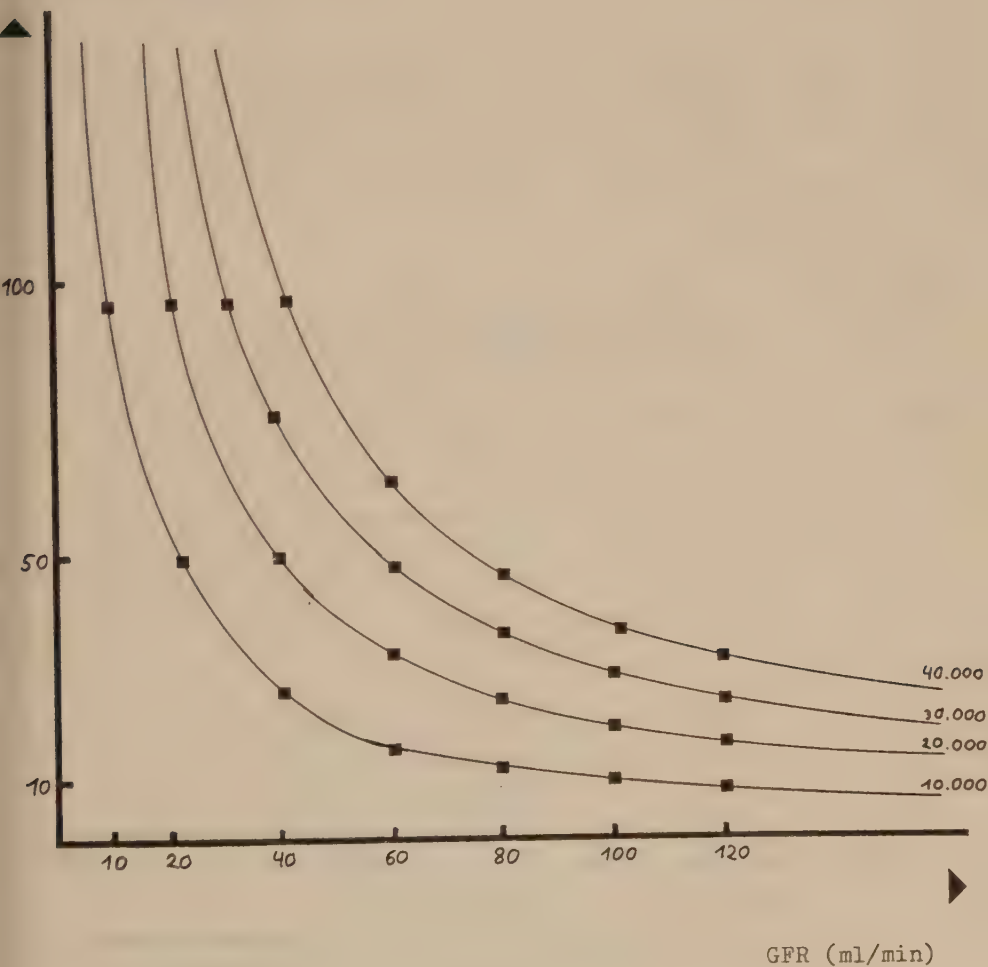


Abb.2: Abhängigkeit des Serum-Inhibitorspiegels von der glomerulären Filtrationsrate

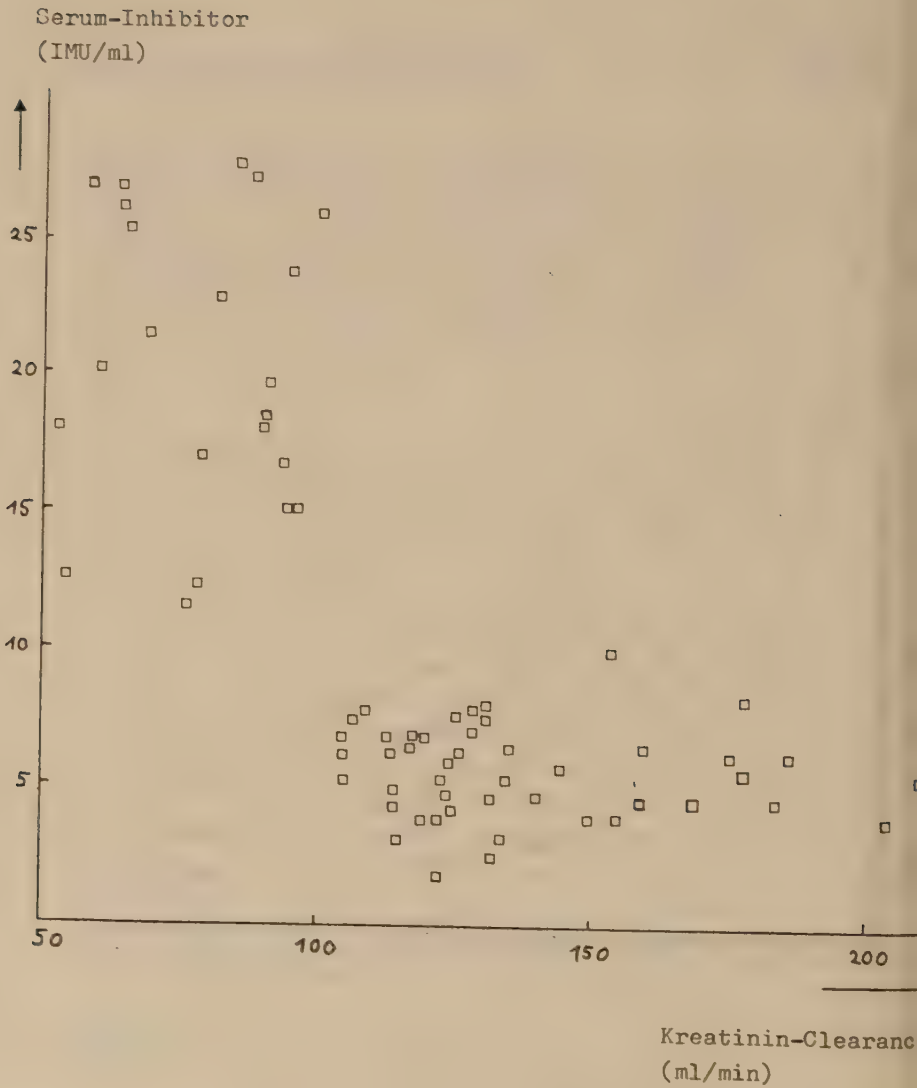


Abb.3: Abhängigkeit des Serum-Inhibitorspiegels von der Kreatinin-Clearance

C. Zusammenfassung

Thema unserer Untersuchungen war die Frage, wie der säurestabile Proteaseninhibitor renal ausgeschieden wird und ob seine Serum- und Urinkonzentrationen Rückschlüsse auf die Nierenfunktion zulassen.

Es zeigte sich eine enge Korrelation zwischen Serumkreatininkonzentration, Kreatininclearance und Seruminhibitorspiegel im physiologischen und pathologischen Bereich. Im Unsicherheitsbereich der Kreatininclearance zwischen 70 und 100 ml/min manifestiert sich nach unseren Ergebnissen eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate frühzeitig in einem signifikanten Anstieg des Seruminhibitorspiegels, während die Serumkreatininkonzentration noch im oberen Normbereich liegt.

Die Inhibitorclearance ist zur Beurteilung der Nierenfunktion ungeeignet, da weder Filtrationsrate noch Rückresorptionsquote bisher bekannt sind. Außerdem ist die Tagesausscheidung des I 34 erheblichen Schwankungen unterworfen. Theoretische Überlegungen und der Vergleich mit unseren Werten sprechen allerdings dafür, daß der Inhibitor zu 0,5-1,0% filtrierte und nicht rückresorbiert wird.

D. Material und Methoden

I. Trypsin-Hemmtest

1. Material

Trypsin (EC 3.4.4.4.) vom Rind, behandelt mit TPCK N-alpha-Benzoyl-D,L-Arginin-4-Nitroanilid (BAPA) der Firma Merck/Darmstadt

2. Vorbereitung der Blut- und Harnproben

a. Erythrozyten abzentrifugieren

b. Enteiweißen: 5 ml Serum

+ 0,5 ml Perchlorsäure 70%

c. Zentrifugieren bei 5000 U (10 min)

d. Überstand filtrieren

e. Neutralisation auf pH 7,8: z.B. 2,5 ml Überstand
+ 0,5 ml NaOH

3. Stammlösungen

10 mU Trypsin (bei der von uns verwendeten Enzympräparation etwa 12 µg) in
0,2 ml 0,0025 N HCl

0,2 M Triäthanolamin-HCl-Puffer, pH 7,8

BAPA gelöst in Wasser mit einer Endkonzentration von 73 µmol/l

4. Testansatz

0,2 ml Trypsin

1,2-1,8 ml Puffer

0,6-0,0 ml Testlösung

Start mit 1,0 ml BAPA

E₄₀₅ der ungehemmten Reaktion = 0,033/min

5. Bestimmung der Inhibitoren anhand der Hemmkapazität

Es wurde die antiproteolytische Wirkung der Lösungen gegen Trypsin bestimmt. Eine Inhibitor-milliunit ist diejenige Inhibitormenge, die 1 mU Trypsin zu hemmen vermag. Eine Trypsinmilliunit ist diejenige Trypsinmenge, die 1 μ mol BAPA pro Minute bei 25° hydrolysiert. Spektrophotometrisch bewirkt 1 Trypsinmilliunit unter Standardbedingungen eine Extinktionszunahme von $E=0,033/\text{min}$. Die Verminderung der Extinktionszunahme um den gleichen Betrag bei Inhibitorzusatz in Trypsin-standardansätzen zeigt 1 IMU an.

II. Bestimmung von wahren Kreatinin

1. Material

- a. Pikrinsäure, 0,48%ig
- b. 0,38 N Natronlauge
- c. gesättigte Oxalsäurelösung
- d. Fullererde-Suspension
- e. Natriumwolframat-Lösung
- f. 0,27 N Schwefelsäure
- g. Standard (Monitrol-1 der Firma DADE)

2. Arbeitsweise

- a. 200 μ l Serum in Eppendorf-Gefäß pipettieren
 - + 100 μ l 10%iges Na-Wolframat
 - + 500 μ l 0,27 N SchwefelsäureMischung 30 Sek. rütteln und 1 Min. zentrifugieren

- b. 500 µl vom klaren Überstand (=Serumfiltrat)
in ein zweites Eppendorf-Gefäß pipettieren
+ 500 µl Fullererde-Suspension (5%ig)
+ 50 µl gesättigte Oxalsäurelösung
Mischung 2 Min. rütteln und 2 Min. zentrifugieren. Klaren Überstand verwerfen!
- c. Zur abzentrifugierten Fullererde gibt man
500 µl Pikrinsäure (0,48%ig)
+ 400 µl 0,38 N Natronlauge
und wirbelt mit dem Mikromix bis zur gleichmäßigen Verteilung auf.
- d. Suspension 10 Min. rütteln und 1 Min. zentrifugieren und 10 Min. stehenlassen.
400 µl vom klaren Überstand werden im Photometer bei der Wellenlänge ^{CD}509 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen.

Berechnung:

$$1. \frac{\text{Ex}_{\text{Analyse(Urin, Serum)}}}{\text{Ex}_{\text{Normalserum(Monitrol)}}} = \text{mg\%}$$

$$\text{bei Urin: } \frac{\text{Ex}_{\text{Analyse}}}{\text{Ex}_{\text{Monitrol}}} \times \text{Verdünnung} = \text{mg\%}$$

$$2. \frac{\text{Min.-Volumen} \times \text{Urinkonzentration in mg\%}}{\text{Serum in mg\%}} = \text{ml/min}$$

$$3. \frac{(\text{Mittelwert-}) \text{Ergebnis}}{\text{Körperoberfläche}} \times 1,73 \text{ m}^2 = \text{ml/min}$$

Literaturverzeichnis

- 6) B r o m f e n b r e n n e r J., J. Allergy 19, 71 (1948)
- 29) D e e t j e n P., J.W.Boylan, K.Kramer, Niere und Wasserhaushalt, Verlag Urban & Schwarzenberg (1973)
- 31) D u t z H., Nierendiagnostik, VEB Gustav Fischer-Verlag Jena (1972)
- 24) F a a r v a n g H.J., The urinary trypsin inhibitor in man (meningin), Scand.J.clin.Lab. Invest. 17,1 (1965)
- 34) F a l l J., Dissertation, Med.Fak.Univ.München (1974)
- 13) F r i t z H., Habilitationsschrift, Med.Fak. Univ.München (1969)
- 19) F r i t z H., E.Fink, M.Gebhard, K.Hochstraßer, E.Werle, Z.physiol.Chem.350,933 (1969)
- 3) G r o b D., J.gen.Physiol.26,423 (1943)
- 18) H a y n e s R., R.E.Feeney, Biochemistry 7, 2547 (1968)
- 14) H a y n e s R., D.T.Osuga, R.E.Feeney, Biochemistry 6, 541 (1967)
- 22) H i l l a W., Dissertation, Med.Fak.Univ.München (1976)
- 5) H l a d o v e c J., Z.Horakova, V.Mansfeld, Arch.int.pharmakodyn. 128,343 (1960)
- 9) H o c h s t r a ß e r K., Habilitationsschrift, Med.Fak.Univ.München (1969)
- 10) H o c h s t r a ß e r K., Clinical Enzymology, pp.57-60 (1970)
- 23) H o c h s t r a ß e r K., G.Bretzel, H.Peuth, W.Hilla, K.Lempart, Z.physiol.Chem.357,153-167 (1976)

- 21) H o c h s t r a ß e r K., H. Feuth, J. Fall,
B. Kemkes, Klin. Wschr. 52, 1015-1017 (1974)
- 15) H o c h s t r a ß e r K., K. Illchman, E. Werle,
Z. physiol. Chem. 350, 655 (1969)
- 11) H o c h s t r a ß e r K., E. Werle, Z. physiol.
Chem. 249, 350 (1969)
- 12) L a s k o w s k y M. sr., F. C. Wu, J. biol. Chem.
204, 797 (1953)
- 32) L i s s n e r J., O. Hug, Münchner Radiologie-
skriptum (1974)
- 1) M a n s f e l d V. A., A. Ziegelhöffner, Z. Hora-
kova, J. Hladovek, Naturwissenschaften 46, 172
(1959)
- 27) P r o k s c h G. J., J. Lanci, G. B. Norschow,
Clin. Biochem. 6, 200 (1973)
- 25) P r o k s c h G. J., J. I. Routh, J. Lab. clin.
Med. 79, 491 (1972)
- 26) P r o k s c h G. J., J. I. Routh, J. M. Smith, Clin.
Biochem. 5, 242 (1972)
- 28) R i c k W., Klin. Chemie u. Mikroskopie, Sprin-
ger-Verlag (1974)
- 7) R o c h a e S i l v a M., "Anaphylaxis",
International Textbook of Allergy, Ed. J. M. Damar,
Munksgaard Copenhagen, p. 11 (1959)
- 33) S c h u l t z e H. E., J. F. Heremans, Molecular
Biology of Human Proteins, Elsevier Publishing
Company (1966)
- 2) S h a i n Y., A. M. Mayer, Physiol. Plant. 18,
853 (1965)
- 4) S h u l m a n N. R., J. biol. Chem. 213, 656 (1943)
- 30) S i e g e n t h a l e r W., Klin. Pathophy-
siologie, Thieme Verlag (1973)
- 17) S t e i n e r R. F., Nature 204, 579 (1964)

- 16) S t e i n e r R.F., Biochem.Biophys.Acta 100,
111 (1965)
- 8) U n g a r G.,H.Hayashi, Ann.Allergy 16,542
(1958)
- 20) V o g e l R.,I.Trautschold,E.Werle, Natür-
liche Proteinase-Inhibitoren,Thieme-Verlag
(1966)
- 35) W e r l e E., Neue Asp.d.Tras.Therapie,Bd.3,
49 (1969)

Herrn Prof.Dr.K.Hochstraßer,Leiter des biochemischen Laboratoriums der HNO-Klinik der Universität München,bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Stellung des Themas,seine Hilfe und Führung bei der Ausführung dieser Arbeit und das Überlassen eines Arbeitsplatzes in seinem Laboratorium.

Herrn Prof.Dr.H.H.Naumann,Direktor der Klinik und Poliklinik für HNO-Leiden an der Universität München,danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Zum Schluß möchte ich es nicht versäumen,auch Frau S.Heindl,Fräulein K.Lempart und Fräulein R.Ebner für ihre freundliche Assistenz bei der Durchführung der Experimente zu danken.

Lebenslauf

Ich, Ute Mohrdieck, wurde am 25.6.1952 als erstes Kind des Dentisten Gerhard Mohrdieck und der Volksschullehrerin Maria Mohrdieck, geb. Hollmann, in Wilster/Holstein geboren. Dort wurde ich im April 1959 eingeschult. Da mein Vater inzwischen als Berufsoffizier in die Bundeswehr eingetreten war, wechselten wir im Mai desselben Jahres den Wohnsitz, und ich besuchte von da an die Volksschule in Ulmen/Eifel. Nach Abschluß der vierten Klasse trat ich 1963 in das Martin-von-Cochem-Gymnasium in Cochem/Mosel ein. Nach einer Versetzung meines Vaters war ich vom Mai 1965 bis September 1967 Schülerin des Mariengymnasiums in Jever/Oldenburg. Ab September 1967 besuchte ich den neusprachlichen Zweig des Descartes-Gymnasiums in Neuburg an der Donau, wo ich im Mai 1971 die Reifeprüfung ablegte. Zum Wintersemester 1971 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Medizinstudium. Im September 1972 machte ich das Vorphysikum, im April 1974 das Physikum. Im März 1975 bestand ich den ersten Teil des Staatsexamens.

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

